



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2011/2012

Hugo Manuel Taveira da Cunha
Vírus de Epstein-Barr e o
desenvolvimento de Linfomas

março, 2012

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Hugo Manuel Taveira da Cunha
Vírus de Epstein-Barr e o
desenvolvimento de Linfomas

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Oncologia

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Professora Doutora Maria Clara Correia Sambade**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Arquivos de Medicina**

março, 2012

FMUP

Eu, Hugo Manuel Taveira da Cunha, abaixo assinado, nº mecanográfico 060801020, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 28/03/2012

Assinatura: Hugo Manuel Taveira da Cunha

Nome: Hugo Manuel Taveira da Cunha

Endereço eletrónico: med06020@med.up.pt **Telefone ou Telemóvel:** 961671789

Número do Bilhete de Identidade: 13335781

Título da Monografia:

Vírus de Epstein-Barr e o desenvolvimento de Linfomas

Orientador:

Professora Doutora Maria Clara Correia Sambade

Ano de conclusão: 2012

Designação da área do projeto:

Oncologia

É autorizada a reprodução integral desta Monografia para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projetos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 28/03/2012

Assinatura: Hugo Manuel Taveira da Cunha

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e família, alicerces da minha formação ao longo do meu percurso de vida.

VÍRUS DE EPSTEIN-BARR E O DESENVOLVIMENTO DE LINFOMAS

Hugo Manuel Taveira da Cunha*

*Aluno do 6ºano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Correspondência:

Hugo Manuel Taveira da Cunha

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro

4200-319 Porto

Portugal

Telefone: +351 961671789

Correio Electrónico: med06020@med.up.pt

Agradecimentos:

Agradeço à Professora Doutora Clara Sambade, minha Orientadora, pela sua disponibilidade, empenho, dedicação e, sobretudo, pelo seu espírito-crítico ao longo de todo o processo de elaboração do presente trabalho. A exigência empregue foi essencial não só para a elaboração do presente trabalho, como para a minha formação, fomentando o espírito crítico e o rigor científico, que são competências essenciais numa medicina baseada na evidência.

Contagens de Palavras:

Resumo – 226

Abstract – 206

Texto Principal – 4996

ÍNDICE

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
Metodologia.....	5
O EBV E A BIOLOGIA DA INFECÇÃO.....	7
Infeção de linfócitos B.....	8
Resposta imune à infeção pelo EBV.....	9
Persistência da infeção.....	10
Homeostasia da variação de fase latente-lítica.....	11
LINFOMAS ASSOCIADOS AO EBV.....	13
Linfoma de Burkitt.....	13
Doenças Linfoproliferativas EBV-positivas em quadros de imunodeficiência.....	16
Linfoma de Hodgkin.....	17
Linfomas de células T.....	19
CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS.....	23
TABELA 1.....	33
TABELA 2.....	35
TABELA 3.....	36
FIGURA 1.....	38

VÍRUS DE EPSTEIN-BARR E O DESENVOLVIMENTO DE LINFOMAS

Resumo:

O vírus de Epstein-Barr (EBV) infecta mais de 90% da população humana em todo o mundo. Após a infecção primária na orofaringe, o EBV estabelece uma infecção latente capaz de persistir, com evasão à resposta imunológica, nos linfócitos B de memória, durante toda a vida do hospedeiro. Ao longo do processo de latência, as células infectadas expressam diferentes tipos de produtos virais.

A associação do EBV ao desenvolvimento de linfomas foi sendo estabelecida, desde a primeira descrição de associação ao linfoma de Burkitt em regiões com infecção endêmica, com base em dados epidemiológicos. O potencial oncogénico do EBV, inicialmente suportado pela capacidade de imortalizar linfócitos B em cultura, foi progressivamente validado por estudos de vários produtos virais, alguns dos quais têm propriedades oncogénicas *in vitro*.

Apesar da ubiquidade da infecção e do potencial oncogénico do EBV, os linfomas associados a este vírus são raros e correspondem a um grupo restrito e bem definido de neoplasias: linfoma de Burkitt, doenças linfoproliferativas/linfomas pós-transplante, linfoma de Hodgkin, linfomas de células NK/T e linfoma T periférico de tipo linfadenopatia angioimunoblástica. As várias neoplasias linfoides associadas ao EBV têm diferentes perfis de expressão viral.

No presente trabalho, procuramos rever as características essenciais da infecção por EBV e algumas características dos linfomas particularmente associados a esta infecção, com o objetivo de evidenciar os mecanismos pelos quais o EBV pode participar na linfomagénesese.

Palavras-Chave: Vírus Epstein-Barr; tipos de latência; linfomagénesese

EPSTEIN-BARR VIRUS AND THE DEVELOPMENT OF LYMPHOMAS

Abstract:

Epstein-Barr virus infects more than 90% of the human population worldwide. The primary infection targets B lymphocytes in the oropharynx. Subsequently, EBV establishes a latent and persistent infection in memory B lymphocytes evading the immune system. Over the process of latency infected cells express several types of viral products.

The association between EBV and lymphoma development stems from the description of Burkitt's lymphoma in geographic areas where EBV infection is endemic. The systematic search for EBV in lymphoma material led to a clear definition of the spectrum of lymphoid malignancies associated with EBV infection that, besides Burkitt's lymphoma, encompasses post-transplant lymphoproliferative disease and lymphoma, classical Hodgkin's lymphoma, NK/T cell lymphoma of the nasal type, and peripheral T cell lymphoma, angioimmunoblastic type. These lymphoid neoplasias associated with EBV display different patterns of viral expression.

The oncogenic potential of EBV, initially supported by its capacity of immortalizing B lymphocytes in culture, was progressively validated by numerous studies of its products in different model systems. Several EBV gene products are currently known to be oncogenic.

The present work reviews the main characteristics of EBV infection as well as some characteristics of EBV-associated lymphomas in an attempt to draw attention to the mechanisms underlying the role of EBV in lymphomagenesis.

Key Words: Epstein-Barr virus; types of latency; lymphomagenesis

INTRODUÇÃO

O vírus de Epstein-Barr (EBV), um dos membros dos *Herpesviridae*, descrito pela primeira vez em 1964 em culturas de células de Linfoma de Burkitt (LB) proveniente de uma região endémica (1), infecta mais de 90% da população humana (revisto em 2). Linfócitos B infetados por EBV constituem o reservatório viral responsável pela persistência da infeção durante toda a vida do hospedeiro (3, 4). Para além da associação do EBV ao LB, verificada antes da identificação do EBV como agente etiológico da mononucleose infecciosa (MI) (5), outras associações a neoplasias linfóides foram descritas, culminando, em 1997, com a classificação do EBV como agente carcinogénico pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC) (6).

In vitro, o potencial oncogénico do EBV é demonstrado pela ativação, proliferação e imortalização de linfócitos B infetados, dos quais derivam as linhas celulares linfoblastóides (revisto em 7, 8).

Embora a infeção por EBV seja comum e ubíqua, as neoplasias que se lhe associam particularmente são raras e algumas situações têm uma distribuição geográfica restrita. Estes factos sugerem que o EBV, enquanto agente tumorigénico, não é suficiente para a transformação neoplásica. Por outro lado, é interessante notar que o perfil de expressão vírica difere entre os tipos de neoplasias; este facto sugere que o EBV poderá desempenhar papéis distintos na patogenia das neoplasias linfóides a que está associado.

O presente trabalho tem por objetivo, após breve revisão dos aspetos essenciais da biologia do EBV e das características particulares da infeção por este agente, rever criticamente o papel do EBV na patogénese dos linfomas aos quais tem sido associado.

Metodologia

A metodologia utilizada foi a pesquisa bibliográfica orientada, que iniciámos pela Pubmed com a expressão “EBV infection and lymphoma development”. Solicitamos revisões publicadas nos últimos 10 anos. Seleccionamos publicações em revistas de maior impacto científico, a partir das quais fizemos

pesquisa bibliográfica seletiva sobre características particulares da infecção por EBV e sobre tipos particulares de linfomas associados a este vírus.

O EBV E A BIOLOGIA DA INFECÇÃO

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é constituído por uma cadeia dupla linear de DNA, um envelope lipídico (que contém as glicoproteínas de membrana) e uma nucleocápside icosaédrica (revisto em 2). O seu ciclo de vida inicia-se com a entrada num tipo celular permissivo na orofaringe e, na população infetada, ocorrem dois tipos de situação: em parte das células o EBV está em fase replicativa, o que resulta em lise celular e libertação de novas partículas víricas (fase lítica da infeção); em outras células não há replicação vírica e a expressão de produtos virais modifica-se ao longo do tempo atingindo uma expressão mínima, que evade os mecanismos de defesa do indivíduo e permite a persistência da infeção durante toda a vida do hospedeiro.

A natureza do tipo celular permissivo à infeção na orofaringe é controversa, uma vez que alguns estudos apontam para ciclos iniciais de replicação vírica em células epiteliais, com infeção posterior dos linfócitos B sub-mucosos, e outros sugerem a infeção inicial direta dos linfócitos B (revisto em 2). Achados mais recentes apontam para a ligação das partículas víricas à membrana do linfócito B, com infeção inicial deste tipo celular. Este facto não invalida a possibilidade de infeção das células epiteliais como resultado de um “mecanismo de transferência”: mediante interação de membranas, os chamados conjugados célula B – célula epitelial permitem a passagem de partículas víricas da superfície linfóide para a célula adjacente, sem existir evidência de fusão celular (9). Qualquer que seja o mecanismo inicial da infeção primária, os linfócitos B são o reservatório da infeção (3, 4) e durante a fase latente surgem reativações ocasionais, com passagem à fase lítica (revisto em 7,10,11).

Epidemiologicamente, a infeção primária tem dois picos de incidência etária. O primeiro, típico de países não industrializados com baixos padrões higiénicos, ocorre até aos 2 anos de idade, geralmente como infeção primária assintomática. O segundo, típico de países industrializados, ocorre na adolescência e pode traduzir-se, em 25-50% dos casos, na manifestação clínica mais comum da infeção pelo EBV, a MI (12, 13).

Infeção de linfócitos B

No mecanismo de infeção dos linfócitos B, as glicoproteínas do envelope vírico são essenciais. Assim, a gp 350, glicoproteína *major* do envelope vírico, interatua com o recetor da fração C3d do complemento na superfície celular, que funciona como recetor vírico (14). Esta interação permite a ligação da glicoproteína vírica gp42 ao HLA classe II na membrana do linfócito B que, por sua vez, e com a participação das glicoproteínas víricas gB e gH-gL, desencadeiam a fusão do envelope vírico com a membrana celular (15; revisto em 16).

Na MI, quadro de infeção primária pelo EBV clinicamente individualizado, a análise dos tecidos linfóides amigdalinos permitiu verificar que a grande maioria dos linfócitos B infetados está em fase latente (4). A pequena parte da população linfóide infetada em fase lítica, que liberta partículas víricas, apresenta características de diferenciação plasmocitóide (4, 17; revisto em 2, 11).

Na fase lítica da infeção são expressos perto de 100 genes virais, enquanto na fase de latência a expressão vírica é restrita e variável (revisto em 2). As proteínas de latência incluem 6 EBNAs (Epstein-Barr nuclear antigens) e 3 LMPs (latent membrane proteins), que participam na regulação do ciclo de vida viral e na modulação de diversos mecanismos de regulação da célula hospedeira (Tabela 1). Na infeção latente são ainda expressos dois RNA não-codificantes, os EBERs (Epstein-Barr encoded RNA), bem como transcritos dos genes BART e BHRF1, respetivamente localizados nas regiões BamHI A e BamHI H, os microRNAs ou miRs (revisto em 18; 19, 20). De salientar que, sob a designação geral de fase de latência, são conhecidas quatro tipos de situações (tipos 0 a III) diferentes entre si conforme o padrão de expressão génica viral (Tabela 2).

Nos tecidos linfóides amigdalinos de indivíduos com MI, a população linfóide em fase latente da infeção expande-se significativamente, ocupando as áreas extrafoliculares; nesta população observam-se pelo menos três dos quatro tipos de latência clássicos (tipos I a III) e um padrão “aberrante” (EBNA-2+/ LMP-1-), sendo este último o mais comum (3, 17). No sangue periférico destes doentes, a infeção pelo EBV é detetada quase exclusivamente em células B de memória, que podem constituir

50% da população total deste tipo celular no momento do diagnóstico clínico (21, 22; revisto em 23). No sangue periférico dos portadores saudáveis, o EBV é detetado também quase exclusivamente em células B de memória, numa fração muito inferior à verificada durante a MI (22, 24). As células B de memória EBV-positivas não expressam proteínas víricas ou a expressão viral é muito restrita; com efeito, o programa de “verdadeira latência” não é consensual (Tabela 2) (22; revisto em 7, 24).

Resposta imune à infecção pelo EBV

Algumas das proteínas víricas expressas nas células infetadas permitem o reconhecimento imunológico de antígenos virais, desenvolvendo-se uma resposta que engloba efetores humorais e efetores celulares (10).

A resposta imunológica humoral decorre da ativação de linfócitos B, por antígenos do envelope do EBV e pelos antígenos de fase lítica e de latência expressos nos linfócitos B infetados, e culmina na produção de anticorpos dirigidos a esses antígenos, detetáveis durante a MI (7, 11).

A resposta imunológica celular é constituída pela ativação de células NK, linfócitos T CD4+ e CD8+ citotóxicos. Numerosos estudos suportam que as células mais importantes no controlo da infeção são os linfócitos T CD8+ (revisto em 2, 10). A análise molecular do TCR de populações reativas de linfócitos T CD8+ revelou um padrão de oligoclonalidade, com especificidades para epítomos expressos em células infetadas pelo EBV. Durante a fase aguda da MI, cerca de 40% da população total de linfócitos T CD8+ é dirigida a um epítomo da proteína lítica BZLF-1, enquanto apenas cerca de 2% dessa população é específica para um epítomo da família de proteínas de latência EBNA-3A, -3B, -3C. Controlada a infeção aguda, e nos meses que se seguem à recuperação clínica da infeção, a resposta imunológica ao EBV mantém-se maioritariamente composta por linfócitos T CD8+ dirigidos a epítomos líticos (especificidades individuais de 0,2 – 2% para epítomos líticos e de 0,05 – 1% para epítomos de latência).

Relativamente à resposta celular T CD4+, está documentado que esta população também atinge um pico durante a MI, mas bastante inferior à proliferação oligoclonal reativa verificada para as células T CD8+ (10). Durante a infecção aguda parece haver resposta específica T CD4+ semelhante para epítomos líticos e epítomos de latência (revisto em 25). As respostas dos linfócitos T CD4+ epítomo-específicos para as proteínas de latência têm frequências pelo menos 10 vezes menores que os equivalentes T CD8+, sendo a EBNA-1 o antígeno imunodominante (10, 26). A importância relativa da resposta celular T CD4+ e da apresentação de antígenos do EBV pela via do MHC II ainda não são claras.

A maioria dos linfócitos B infectados é eliminada pela resposta imunológica sumariamente descrita, ela própria responsável pelas manifestações clínicas da MI (27). Os linfócitos B de memória infectados, em latência de tipo 0 ou com expressão viral muito restrita, não são alvo da resposta imunológica pelo que constituem o subtipo celular onde o EBV estabelece a infecção que persiste durante toda a vida do hospedeiro (21, 20; revisto em 11, 23).

Persistência da infecção

Através da análise dos padrões de expressão vírica em linfócitos B em diferentes estádios de diferenciação, provenientes de tecidos linfóides de indivíduos com infecção persistente assintomática, Thorley-Lawson e colaboradores propuseram um modelo para a persistência da infecção pelo EBV (28; revisto em 23). Segundo este modelo, o EBV infecta células B “naive” que, ativadas e sob o “programa de crescimento” iniciariam um processo de diferenciação semelhante ao que ocorre no centro germinativo (CG), acompanhando-se de modificação do perfil de expressão viral, que passa a latência II (Fig. 1). Com efeito, na latência de tipo II, designada por “programa de sobrevivência”, são expressas as proteínas víricas LMP-1 e LMP-2A, que resultam em sinais de sobrevivência celular semelhantes à sinalização pelo CD-40 e pelo BCR, respetivamente, durante a reação do CG normal (Tabela 1) (28, 29, 30, 31; revisto em 32). Esta sinalização permitiria às células infectadas ultrapassar a

seleção negativa a que estariam sujeitas no CG. Assim, as células B “naive” infectadas diferenciar-se-iam em células B de memória (Fig. 1) constituindo o reservatório da infecção persistente (revisto em 23; 21, 22). A detecção de EBNA-1 nas células B de memória, observada durante a normal divisão dessas células, é enquadrada neste modelo como um padrão de expressão transitório necessário à divisão do DNA vírico (Tabela 1 e 2) (21).

Contudo, o modelo formulado apresenta lacunas. A diferenciação em células B de memória infectadas através da reação do CG é posta em causa por estudos que sugerem que os linfócitos B infectados, durante e após a MI, raramente se localizam no CG (33; revisto em 34). Durante a MI, as células do GC EBV-positivas estudadas, tinham evidência de hipermutação somática, mas não se observou variação clonal, isto é, não se observou diversidade na utilização de segmentos V das cadeias de imunoglobulinas (33; revisto em 34). Estes factos contribuíram para que Kurth e colaboradores (17, 33) sugerissem que o EBV infecta diretamente linfócitos em vários estadios de diferenciação o que, sendo admissível, não explica a persistência da infecção apenas em células B de memória. Outra das questões colocadas ao modelo de Thorley-Lawson e colaboradores é facto de, na MI, se ter observado que a maioria das células B infectadas do CG exprimem um fenótipo de latência “aberrante” (EBNA-2+/ LMP-1-), não detetado no modelo referido, nem considerado nos quatro tipos de latência “clássicos” (Tabela 2) (17, 33). As reservas ao modelo, baseadas em resultados obtidos em material de doentes com MI, levaram os autores do mesmo a sugerir que a MI é uma situação distinta da infecção que acontece na maioria da população (33).

Homeostasia da variação de fase latente-lítica

Vários estudos procuraram esclarecer os mecanismos subjacentes à transição entre fase de latência e fase lítica da infecção. Um modelo proposto preconiza que a receção de sinais de ativação e diferenciação por células B de memória com infecção latente desencadeia os mecanismos normais com diferenciação final em plasmócitos; nestas células deixam de ser expressos os genes de latência e

inicia-se a expressão de genes de fase lítica, com replicação e libertação vírica subsequente (35, 36). Na transição entre fase latente e fase lítica, é central a expressão de dois genes, o BRLF-1 e o BZLF-1, codificadores de fatores de transcrição (RTA e ZTA, respetivamente) de genes do “programa” de fase lítica (revisto em 37). Estudos recentes têm suportado um papel relevante da via do NF- κ B no equilíbrio homeostático entre fase latente e fase lítica, na medida em que a ativação deste fator está associada à inibição da expressão de genes líticos, através da supressão da expressão dos transativadores RTA e ZTA (38). Adicionalmente, o fator de transcrição NF- κ B regula positivamente a expressão de LMP-1 e esta proteína, por sua vez, recruta a via do NF- κ B, pelo que se estabelece um mecanismo de retroação positivo (na manutenção de níveis de LMP-1 e de NF- κ B elevados durante a fase de latência) (37, 39, 40).

LINFOMAS ASSOCIADOS AO EBV

Em termos epidemiológicos, a participação do EBV no desenvolvimento de linfomas é sugerida, em primeira instância, pela frequência de detecção do EBV nas células neoplásicas de alguns tipos de linfomas, com associações que vão desde os 40% para o Linfoma de Hodgkin clássico (LHc) até cerca de 100% para o Linfoma de Burkitt endêmico (LBen) e o Linfoma extranodal de células NK/T de tipo nasal (revisto em 7, 26, 41, 42).

O potencial oncogénico do EBV é suportado *in vitro* pela imortalização de células B infectadas pelo vírus, nas quais se observa um padrão de latência tipo III (Tabela 2) (revisto em 7, 8, 11). As proteínas virais essenciais a esse efeito oncogénico parecem ser as proteínas de latência EBNA-1, -2, -3A e -3C e LMP-1 (revisto em 7, 8). As EBNA-1 e LMP-1 são consideradas oncogenes virais uma vez que os respetivos modelos de ratinhos transgénicos desenvolvem linfomas de células B (30, 43). Mais recentemente, dados experimentais suportam a possibilidade de um papel oncogénico para os EBERs que, apesar de não serem essenciais à transformação de células B *in vitro*, potenciam a tumorigénese em linhas celulares LB-EBV negativas (19, 44; revisto em 18).

Em seguida analisaremos cada uma das linfoproliferações linfóides fortemente associadas ao EBV.

Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt endêmico (LBen) é a um pilar no estudo do papel do EBV no desenvolvimento de linfomas, uma vez que o vírus é detetado em perto de 100% dos casos (Tabela 3). A detecção de EBV monoclonal na totalidade as células neoplásicas permitiu concluir que a infeção antecede a expansão clonal neoplásica (45; revisto em 2, 23), facto compatível com a participação do vírus na patogénese da neoplasia.

A translocação do oncogene c-myc (cromossoma 8) para um de 3 loci das cadeias das imunoglobulinas (mais frequentemente a cadeia pesada, no cromossoma 14) é uma constante no LB.

Esta translocação tem como consequência a ativação constitutiva de c-myc, responsável pelo aumento da proliferação e aceleração do ciclo celular (revisto em 32, 41, 46). A translocação e ativação de c-myc é necessária mas não suficiente ao desenvolvimento do LB, sendo essenciais alterações genéticas adicionais que inibam os efeitos pró-apoptóticos daquele gene, por exemplo na via p14^{ARF}/MDM2/p53 ou, mesmo, mutações no segmento de c-myc translocado, cuja origem é habitualmente atribuída ao mecanismo de hipermutação somática no CG (revisto 46, 47, 48).

Na maior parte dos casos de LBen a translocação inclui a quase totalidade do c-myc, enquanto na maior parte dos casos de LB esporádico (LBes), com taxas de associação ao EBV da ordem de 15-20%, o segmento do cromossoma 8 translocado não inclui as regiões reguladoras do exão 1 do c-myc. Por outro lado, os casos de LB EBV-positivos associam-se a pontos de quebra no cromossoma 8 fora do gene c-myc e a altas taxas de mutação somática (49, 50). Estes dados sugerem diferentes mecanismos de expressão desregulada do c-myc nas formas de LB com e sem associação ao EBV. Relativamente aos pontos de quebra no cromossoma 14, em cerca de 60% dos LB a translocação envolve a região VD-J das cadeias pesadas das imunoglobulinas. No entanto, é interessante notar que o envolvimento da região de “class switching” (S μ) é mais frequente no LBes do que no LBen (rácio de 2:1) (49, 50). Estes dados sugerem que as translocações tendem a ocorrer em momentos de diferenciação linfóide diferentes nas formas de LB tipicamente associadas e não associadas ao EBV.

No LB EBV-positivo observa-se um perfil de latência de tipo I (revisto em 2, 32, 51). Admitindo a participação do EBV na patogénese do LB, a ausência de expressão das restantes proteínas víricas essenciais à imortalização de células B in vitro é intrigante, uma vez que não se conhecem mecanismos pelos quais aquele padrão de expressão possa contribuir para o desenvolvimento/manutenção neoplásica. A interpretação corrente sugere que o EBV seja necessário à manutenção da biologia maligna de células tumorais de LB EVB-positivas, postulando que a EBNA-1, os EBERs ou os miRNAs possam ter um papel análogo ao das alterações genéticas adicionais, atrás referidas, que permitem inibir os efeitos pró-apoptóticos de c-myc, embora sem necessariamente as substituir completamente (19, 43, 52, 53; revisto em 18, 47, 51). Em cerca de 15% dos casos de LBen foi

descrita a presença de EBV mutante, com deleção do gene EBNA-2 que tem como consequência a expressão constitutiva de BHRF1. A proteína codificada por este gene, normalmente expresso na fase lítica, é análoga à BCL-2 e provavelmente responsável por contribuir para a resistência à apoptose durante essa fase da infecção (48). Este facto suporta que, nos casos de LBen com EBV mutante, o vírus é um fator anti-apoptótico central (48). A relevância de um papel do EBV como regulador negativo da apoptose é apoiada pela demonstração da maior resistência à apoptose em células de LBen EBV-positivas, quando comparadas com as mesmas células EBV-negativas; nas células EBV-positivas, a maior proteção à apoptose foi observada nas células com a forma mutante de EBV e a menor nas células em latência tipo I (54).

Um outro mecanismo de provável participação do EBV na tumorigénese do LB consiste no facto do EBNA-1 inibir o seu próprio processamento antigénico. Assim, é de admitir que o EBV tenha um papel facilitador do “escape” imunológico das células neoplásicas, cooperando com a sobre-expressão de c-myc que induz um fenótipo não imunogénico (55; revisto em 26).

Por último, é imperioso referir a sobreposição das áreas geográficas de LBen com as de maior incidência de malária (revisto em 51, 56). A ativação policlonal de células B, preferencialmente células de memória, por antígenos do *Plasmodium falciparum* traduz-se provavelmente por ativação de células infetadas por EBV que, entrando em ciclo lítico e libertando partículas virais, justificam as cargas víricas persistentemente elevadas ocorridas nos indivíduos residentes naquelas áreas (56). A estimulação antigénica de linfócitos B provocada pela infeção malárica e/ou reativação do EBV poderá explicar o risco aumentado de alterações oncogénicas, normalmente associado à proliferação linfóide. Desta forma, a infeção malárica é fortemente sugerida como um cofator na patogénese do LBen.

Doenças Linfoproliferativas EBV-positivas em quadros de imunodeficiência

É um facto conhecido que a incidência de doenças linfoproliferativas está aumentada nos casos de imunodeficiência (revisto em 57), e a frequência de detecção do EBV nas linfoproliferações e linfomas de indivíduos com imunodeficiências é superior à observada, nos mesmos tipos de linfomas, em indivíduos imunocompetentes (revisto em 58). Com efeito, a associação ao EBV nos linfomas que ocorrem em imunodeficiências primárias ronda os 95% e é superior a 80% em indivíduos com imunodeficiências secundárias pós-transplante; no contexto da infeção por HIV a taxa de associação atinge os 60%, com diferenças significativas entre os tipos específicos de linfoma (25, 57) (Tabela 3).

Em todas as formas de imunossupressão com deficiente resposta T CD8+, essencial ao controlo da infeção, a reativação da infeção com fases líticas, expansão da carga viral e aumento de células infetadas é comum. Nas células recém-infetadas a expressão viral inicial é de latência III, o “programa de crescimento” considerado “motor” da linfoproliferação (revisto em 2, 7, 8, 11). Em conformidade com esta interpretação, o risco de desenvolvimento da doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT) é particularmente elevado durante o período de maior intensidade da imunossupressão e a diminuição desta acompanha-se, em regra, de regressão da linfoproliferação nas formas de DLPT policlonais, nas quais se observa o padrão de latência tipo III (revisto em 10, 59, 60).

A ocorrência de linfoproliferações policlonais promovidas pelo EBV está, provavelmente, na base do maior risco de desenvolvimento de linfomas, uma vez que um maior número de células infetadas estará em risco de sofrer alterações genéticas inerentes à proliferação linfóide.

Nas DLPT monoclonais observa-se, a maior parte das vezes, um padrão de expressão viral mais restrito (de tipo I ou II), e a resposta destas formas à diminuição da imunossupressão é menor ou não acontece (61, 62, 63; revisto em 57, 58). Estes factos coadunam-se com a interpretação de que o EBV constitui o “motor” das linfoproliferações policlonais das quais podem emergir formas monoclonais resultantes de alterações genéticas adicionais (revisto em 11, 25, 57).

Curiosamente, no contexto da imunodeficiência adquirida por infecção HIV, a maioria dos LB não se associa ao EBV, enquanto todos os casos de linfoma primário do sistema nervoso central são EBV-positivos (revisto em 57, 64) (Tabela 3). A interpretação geralmente aceita para o desenvolvimento de linfomas associados à deterioração da resposta CD4+ decorre do seu papel essencial à manutenção da resposta T CD8+, com papel de vigilância imunológica atuante sobre células anormais e com os efeitos já discutidos sobre a infecção por EBV. A interpretação referida é compatível com as características observadas no linfoma primário do SNC, com um perfil de latência III, e também se coaduna com o perfil de latência III observado em parte dos linfomas B periféricos difusos de células grandes. Contudo, no contexto em análise, a associação do LB ao EBV é semelhante à verificada para o LBes, o perfil de expressão vírica é de latência de tipo I, e geralmente ocorre mais precocemente do que os restantes linfomas associados à infecção por HIV, o que sugere fortemente um mecanismo patogénico diferente. De facto, a interpretação corrente é a de que a excessiva estimulação imunológica nas fases iniciais da infecção por HIV esteja subjacente ao risco elevado de translocações de c-myc em linfócitos B eventualmente infetados (revisto em 25). Curiosamente, a excessiva estimulação imunológica com aumento do risco de anomalias genéticas e transformação neoplásica de células do CG destinada à apoptose, é também invocada para interpretar a presença de EBV em quase 100% dos casos de LHc no contexto de imunodeficiência por HIV.

Linfoma de Hodgkin

A frequência da associação do LH clássico (LHc) ao EBV varia entre os 40% e os 90% (Tabela 3). Os valores mais elevados estão descritos nos países em desenvolvimento da África e América do Sul (90% de associação), nos subtipos histológicos de celularidade mista e de depleção linfocítica, nas crianças e nos adultos com idade superior a 55 anos, e nos quadros de imunodeficiência nos quais atingem 100% no contexto da infecção HIV (revisto em 7, 8, 11). Estes dados epidemiológicos sugerem a existência de mecanismos patogénicos particularmente associados à presença de EBV no LHc. A

demonstração da monoclonalidade do EBV presente nas células de Hodgkin e de Reed-Sternberg (células HRS) reforça a plausibilidade da participação do EBV na patogenia do LHc (65, 66).

A expressão de latência viral de tipo II (“programa de sobrevivência”) nas células HRS EBV-positivas sugere que os efeitos celulares atribuídos a esse padrão de expressão possam estar na base da participação do EBV na patogenia do LHc. Este padrão de expressão viral inclui as proteínas LMP-1 e LMP-2A, que fornecem sinais de sobrevivência celular análogos aos verificados na reação do CG, através da indução da ativação de NF- κ B e da substituição da função do BCR, respetivamente (29, 30, 31, 67). É aceite que na maioria dos casos as células HRS têm origem em células B pré-apoptóticas do CG portadoras de mutações “crippled”, e que a generalidade das células HRS não exprimem genes das imunoglobulina/BCR (revisto em 34, 68; 69). Neste contexto, os factos acima referidos coadunam-se com a proposta de que o EBV facilita o “resgate” de células B “crippled” do CG (70) que, em condições normais, seriam eliminadas por apoptose. Reforçando indiretamente esta interpretação, nos últimos anos vários estudos têm suportado a importância da ativação constitucional de NF- κ B como um mecanismo patogénico central no LH (37, 71; revisto em 72).

É interessante notar que estão descritas alterações genéticas especificamente associadas a casos de LH EBV-negativo que constituem argumentos indiretos, e adicionais, à hipótese do papel patogénico do vírus, que teria um papel análogo e substitutivo dessas alterações nos casos EBV-positivos. Exemplo disso são a relação inversa entre a presença de EBV nas células HRS e os níveis de sinalização de vários recetores “tirosina-cínases”, ou o mesmo tipo de relação entre a presença do vírus e a deteção de mutações de TNFAIP3 (regulador negativo da via do NF- κ B) (73; revisto em 34, 72).

Por último, e como é do conhecimento geral, nas células HRS o fenótipo B é muito restrito ou mesmo inexistente (74). Uma vez que a expressão de LMP-1 ou de LMP-2A se associa a uma diminuição da expressão de genes específicos do fenótipo B, é de admitir que o EBV possa também estar envolvido nos mecanismos de “reprogramação celular” no LH (75, 76).

Linfomas de células T

Surpreendentemente, o EBV associa-se fortemente a tipos particulares de linfomas T. Os mecanismos de infecção destes alvos celulares “atípicos”, que não dispõem de moléculas de superfície propiciadoras da entrada do vírus, não são conhecidos (16; revisto em 42).

No linfoma extranodal de células NK/T de tipo nasal (NK/T-L), o EBV está presente em virtualmente 100% dos casos, independentemente da origem celular (a maioria das vezes em células NK) (revisto em 42, 77, 78). O perfil de expressão vírica, tipicamente latência tipo II, nas células neoplásicas do NK/T-L coaduna-se com um papel do EBV como facilitador da sobrevivência das células neoplásicas. Contudo, as funções atribuídas às proteínas víricas referem-se a estudos em células B, e não em linhas celulares T e NK, nas quais os efeitos dessas proteínas não está definido. A demonstração da monoclonalidade do EBV presente nas células tumorais deste tipo de linfoma é compatível com o envolvimento do EBV nos mecanismos patogénicos (79).

Embora esteja descrita a associação do EBV à leucemia agressiva de células NK em mais de 90% dos casos, não é conhecido o padrão de expressão de proteínas víricas nesta neoplasia (revisto em 42).

No linfoma de células T periférico, de tipo angioimunoblástico (AILDS), a deteção do EBV em quase todos os casos também sugere fortemente um papel do vírus na sua patogénese (80). Neste tipo de linfoma ocorrem frequentemente expansões oligoclonais (ou mesmo monoclonais?) de linfócitos B (81, 82, 83; revisto em 84). A presença do EBV nos dois tipos celulares (linfócitos B e T) nos tecidos linfóides envolvidos pela neoplasia parece ser heterogénea, tendo sido detetado em proporções variáveis, quer de cada um dos tipos celulares, quer da totalidade das células linfóides (80, 81). Esta heterogeneidade sugere que a infecção ocorre após o início da expansão clonal. Até ao momento, não se conhecem estudos da clonalidade vírica no tipo de linfoma em causa. Também não está estabelecido o padrão de expressão viral nos diferentes tipos de células infetadas; em alguns estudos foi detetada expressão heterogénea de EBNA-1 e LMP-1 (80, 82). Estes factos, em conjunto com a expressão de marcadores de estimulação nos linfócitos T neoplásicos, levaram à proposta de um modelo no qual a

ação patogénica do EBV seria mediada pelo estabelecimento de um “loop” de estimulação imunológica entre linfócitos B expressando antígenos víricos e linfócitos T CD4+ ativados (revisto em 84).

CONCLUSÕES

Da revisão efetuada, a primeira conclusão (óbvia) é de que os dados epidemiológicos sobre a detecção do EBV em tipos particulares de linfomas são um fortíssimo pilar do papel patogénico do vírus no desenvolvimento dessas neoplasias. No entanto, podemos também concluir que a demonstração da monoclonalidade do vírus nas células neoplásicas, os diferentes tipos de “programa” de latência viral expressos nos diferentes linfomas e os estudos sobre as funções dos produtos virais em linfócitos B reforçam a participação do EBV na linfomagenese, afastando, sem excluir completamente, a possibilidade da presença do vírus nas células neoplásicas ser meramente accidental.

Relativamente ao objetivo que nos propusemos, podemos concluir que:

- No LB, em que a desregulação do c-myc é o fator transformador inicial mas que requer outras alterações que permitam ultrapassar o efeito pró-apoptótico daquele gene, a presença de EBV pode contribuir para a linfomagenese na medida em que: se propõe que o EBNA-1, os EBER e os miRNA possam ter efeitos análogos às outras anomalias genéticas comuns neste tipo de linfoma; o EBNA-1 coopera com o c-myc para um fenótipo não-imunogénico das células neoplásicas. Por outro lado, nas regiões de LBen, a infeção por *Plasmodium falciparum* com consequente estimulação antigénica acompanhada de reativações da infeção por EBV e propagação desta infeção, constitui um elo entre o desenvolvimento de LB e a presença de EBV;
- Nas linfoproliferações em quadros de imunodeficiência envolvendo as células CD8+, a reativação da infeção por EBV com propagação da população linfóide infetada é um passo importante para que estas populações fiquem sob efeito do “programa de crescimento” dependente do EBV, com aumento do risco de anomalias genéticas nas fases de proliferação intensa;
- Nos LHc associados ao EBV, a interpretação aceite é de que a expressão típica do “programa de sobrevivência” dependente do EBV favorece o escape à apoptose dos linfócitos B com mutações “crippled”. Neste contexto, a expressão de LMP-2A está envolvida num dos mecanismos patogénicos centrais no LH: a ativação das vias do NF- κ B;

- Nos linfomas de células T e NK, a associação ao EBV não é compreendida. Apesar da expressão ocasional de alguns dos produtos de latência do vírus, as funções dessas proteínas em células T e NK não são conhecidas.

REFERÊNCIAS

- (1) - Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med* 1965; 121:761-70.
- (2) - Cohen JI. Epstein-Barr Virus Infection. *N Engl J Med* 2000; 343:481-92.
- (3) - Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997; 182:151-9.
- (4) - Faulkner GC, Burrows SR, Khanna R, Moss DJ, Bird AG, Crawford DH. X-linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol* 1999; 73:1555-64.
- (5) - Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; 59:94-101.
- (6) - International Agency for Research on Cancer. Epstein-Barr Virus. In: IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 70. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/ Human Herpesvirus 8. Lion: IARC Press; 1987. p. 47-373.
- (7) - Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356:461-73.
- (8) - Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22(33):5108-21.
- (9) - Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7065-70.

- (10) - Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:587-617.
- (11) - Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:375-404.
- (12) - Crawford DH, Macsween KF, Higgins CD, Thomas R, McAulay K, et al. A cohort study among university students: identification of risk factors for EBV seroconversion and infectious mononucleosis. *Clin Infect Dis* 2006; 43:276-82.
- (13) - Cohen JL. Epstein-Barr virus infections, including infectious mononucleosis. In: Fauci AS, et al., editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
- (14) - Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearson DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:4510-4.
- (15) - Li Q, Spriggs MK, Kovats S, et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997; 71:4657-62.
- (16) - Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 2003; 77(19):10179-10185.
- (17) - Kurth J, et al. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 2000; 13:485-495.
- (18) - Swaminathan S. Noncoding RNAs produced by oncogenic human herpesviruses. *J Cell Physiol* 2008; 216:321-326.
- (19) - Ruf IK, Rhyne PW, Yang C, Cleveland JL, Sample JT. Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis. *J Virol* 2000; 74:10223-10228.

- (20) - Seto E, Moosmann A, Gromminger S, Walz N, Grundhoff A, Hammerschmidt W. Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1001063.
- (21) - Hochberg D, Souza T, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol* 2004; 78(10):5194-204.
- (22) - Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad U S A* 2004; 101:239-44.
- (23) - Thorley-Lawson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Eng J Med* 2004; 350(13):1328-37.
- (24) - Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998; 9(3):395-404.
- (25) - Pietersma F, Piriou E, van Baarle D. Immune surveillance of EBV-infected B cells and the development of non-Hodgkin lymphoma in immunocompromised patients. *Leuk Lymphoma* 2008; 49(6):1028-1041.
- (26) - Taylor GS, Blackbourn DJ. Infectious agents in human cancers: Lessons in immunity and immunomodulation from gammaherpesviruses EBV and KSHV. *Cancer Lett* 2011; 305:263-278.
- (27) - Foss HD, Herbst H, Hummel M, Araujo I, Latza U, Rancso C, Dallenbach F, Stein H. Patterns of cytokine gene expression in infectious mononucleosis. *Blood* 1994; 83:707-712.
- (28) - Babcock GJ, Hochberg D, Thorley-Lawson DA. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 2000; 13:497-506.

- (29) - Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998; 9(3):405-11.
- (30) - Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11963-8.
- (31) - Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, et al. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocytes responses. *Science* 1999; 286:300-3.
- (32) - God JM, Haque A. Burkitt lymphoma: pathogenesis and immune evasion. *J Oncol* 2010; 2010.pii:516047.
- (33) - Kurth J, Hansmann ML, Rajewsky K, Kuppers R. Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad U S A* 2003; 100:4730-4735.
- (34) - Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(10):801-812.
- (35) - Crawford DH, Ando I. EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology* 1986; 59(3):405-9.
- (36) - Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* 2005; 79(2):1296-307.
- (37) - de Oliveira DE, Ballon G, Cesarman E. NF- κ B signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol* 2010; 18:248-57.
- (38) - Krug LT, et al. Inhibition of NF-kappaB activation in vivo impairs establishment of gammaherpesvirus latency. *PLoS Pathogens* 2007; 3:e11.

- (39) - Guasparri I, Bubman D, Cesarman E. EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* 2008; 111(7):3813-20.
- (40) - Kung CP, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3. *J Virol* 2008; 82:5486-93.
- (41) - Allday MJ. How does Epstein-Barr (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Semin Cancer Biol* 2009; 19(6):366-376.
- (42) - Fox CP, Shannon-Lowe C, Rowe M. Deciphering the role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of T and NK cell lymphoproliferations. *Herpesviridae* 2011; 2:8.
- (43) - Wilson JB, Bell JL, Levine AJ. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J* 1996; 15:3117-26.
- (44) - Yajima M, Kanda T, Takada K. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 2005; 79(7):4298-307.
- (45) - Neri A, Barriga F, Inghirami G, Knowles DM, Neeguaye J, Magrath IT, Dalla-Favera R. Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma. *Blood* 1991; 77(5):1092-5.
- (46) - Lindstrom MS, Wilman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002; 12(5):381-7.
- (47) - Bornkamm GW. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer* 2009; 124(8):1745-55.
- (48) - Kelly GL, Long HM, Stylianou J, Thomas WA, Leese A, Bell AI, Bornkamm GW, Mautner J, Rickinson AB, Rowe M. An Epstein-Barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed in transformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 link. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000341.

- (49) - Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, Jafri A, Dalla-Favera R, Neri A, Gutierrez M, Levine P, Magrath I. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* 1991; 77(7):1516-26.
- (50) - Bellan C, Lazzi S, Hummel M, et al. Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood* 2005; 106(3): 1031-1036.
- (51) - Brady G, Macarthur GJ, Farrell PJ. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 2007; 60(12):1397-402.
- (52) - Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y, Takada K. Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol* 1994; 68(9):6069-73.
- (53) - Kennedy G, Komano J, Sugden B. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(24):14269-14274.
- (54) - Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, Bell AI, Rickinson AB. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(40):14935-40.
- (55) - Staeger MS, Lee SP, Frisan T, Mautner J, Scholz S, Pajic A, Rickinson AB, Masucci MG, Polack A, Bornkamm GW. MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:4550-4555.
- (56) - Chene A, Donati D, Orem J, et al. Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease. New insights on the interaction between *Plasmodium falciparum* and Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol* 2009; 19(6):411-420.
- (57) - Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK. Immunodeficiency-associated lymphomas. *Blood Rev* 2008; 22(5):261-81.

- (58) - Cesarman E. Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett* 2011; 305:163-174.
- (59) - Gottschalk S, Rooney CM, Heslop HE. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* 2005; 56:29-44.
- (60) - Nourse JP, Jones K, Gandhi MK. Epstein-Barr Virus-related post-transplant lymphoproliferative disorders: pathogenetic insights for targeted therapy. *Am J Transplant* 2011; 11(5):888-95.
- (61) - Cen H, Williams PA, McWilliams HP, Breinig MC, Ho M, McKnight JL. Evidence for restricted Epstein-Barr virus latent gene expression and anti-EBNA antibody response in solid organ transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood* 1993; 81(5):1393-403.
- (62) - Brink AA, Dukers DF, van den Brule AJ, Oudejans JJ, Middeldorp JM, Meijer CJ, Jiwa M. Presence of Epstein-Barr virus latency type III at the single cell level in post-transplantation lymphoproliferative disorders and AIDS related lymphomas. *J Clin Pathol* 1997; 50(11):911-8.
- (63) - Oudejans JJ, Jiwa M, van den Brule AJ, Grasser FA, Horstman A, Vos W, Kluin PM, van der Valk P, Walboomers JM, Meijer CJ. Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 1995; 147(4):923-33.
- (64) - Grogg KL, Miller RF, Dogan A. HIV infection and lymphoma. *J Clin Pathol* 2007; 60(12):1365-72.
- (65) - Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; 74(2):810-6.
- (66) - Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, Purtillo DT, Sklar J. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 129(1):86-91.

- (67) - Shair KH, et al. EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkappaB, and Stat3 in B cell lymphomas. *PLoS Pathogens* 2007; 3:e166.
- (68) - Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Eng J Med* 1999; 341(20):1520-9.
- (69) - Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Lammert H, Demel G, Theil J, Wirth T, Stein H. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000; 95(4):1443-50.
- (70) - Mancao C, Altmann M, Jungnickel B, Hammerschmidt W. Rescue of “crippled” germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 2005; 106:4339-4344.
- (71) - Keller SA, et al. NF-kappaB is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. *Blood* 2006; 107:3295-3302.
- (72) - Kuppers R. The biology of Hodgkin’s lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1):15-27.
- (73) - Renné C, Hinsch N, Willenbrock K, Fuchs M, Klapper W, Engert A, Kuppers R, Hansmann ML, Brauninger A. The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin’s lymphoma. *Int J Cancer* 2007; 120(11):2504-9.
- (74) - Schwering I, et al. Loss of B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101: 1505-1512.
- (75) - Portis T, Dyck P, Longnecker R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102(12):4166-78.
- (76) - Vockerodt M, et al. The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin’s Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol* 2008; 216:83-92.

- (77) - Hasserjian RP, Harris NL. NK-cell lymphomas and leukemias: a spectrum of tumors with variable manifestations and immunophenotype. *Am J Clin Pathol* 2007; 127(6):860-8.
- (78) - Chiang AK, Chan AC, Srivastava G, Ho FC. Nasal T/ natural killer (NK)-cell lymphomas are derived from Epstein-Barr virus-infected cytotoxic lymphocytes of both NK- and T-cell lineage. *Int J Cancer* 1997; 73:332-338.
- (79) - Minarovits J, Hu LF, Ismai S, Harabuchi Y, Kataura A, Minarovits-Kormuta S, Osato T, Klein G. Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas. *J Gen Virol* 1994; 75:77-84.
- (80) - Anagnostopoulos I, Hummel M, Finn T, Tiemann M, Korbjuhn P, Dimmler C, Gatter K, Dallenbach F, Parwaresch MR, Stein H. Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood* 1992; 80(7):1804-12.
- (81) - Smith JL, Hodges E, Quin CT, McCarthy KP, Wright DH. Frequent T and B cell oligoclonal in histologically and immunophenotypically characterized angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Am J Pathol* 2000; 156(2):661-9.
- (82) - Brauninger A, Spieker T, Willenbrock K, Gaulard P, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML, Kuppers R. Survival and clonal expansion of mutating “forbidden” (immunoglobulin receptor-deficient) Epstein-Barr virus-infected B cells in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *J Exp Med* 2001; 194(7):927-40.
- (83) - Brüggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, Jasani B, Ott M, Delsol G, Orfao A, Tiemann M, Herbst H, Langerak AW, Spaargaren M, Moreau E, Groenen PJ, Sambade C, Foroni L, Carter GI, Hummel M, Bastard C, Davi F, Delfau-Larue MH, Kneba M, van Dongen JJ, Beldjord K, Molina TJ. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21(2):215-21.

(84) - Dunleavy K, Wilson WH, Jaffe ES. Angioimmunoblastic T cell lymphoma: pathobiological insights and clinical implications. *Curr Opin Hematol* 2007; 14(4):348-53.

TABELA 1 - Produtos de expressão gênica de latência do EBV e respectivas funções.

Gene	Produto(s)	Principais funções
BKRF1	EBNA-1	<ul style="list-style-type: none"> • Manutenção e replicação do DNA vírico episomal (revisto em 2, 7, 34); • Inibição do processamento antigénico (revisto em 26); • Atividade anti-apoptótica (em células de LB) (53; revisto em 32, 41).
BYRF1	EBNA-2	<ul style="list-style-type: none"> • Fator de transcrição de genes virais (EBNAs, LMP-1 e LMP-2) e de genes da célula infectada (como os c-FGR e c-myc; em conjunto com a EBNA-LP aumenta a expressão de Ciclina D2) (revisto em 2, 7, 12, 32).
BERF1	EBNA-3A	<ul style="list-style-type: none"> • EBNA-3C: promoção da progressão no ciclo celular (revisto em 32); co-fator de transcrição da LMP-1, na presença de EBNA-2 (revisto em 12); • EBNA-3A e -3C: interação funcional na inibição da expressão de Bim (oposição aos efeitos pró-apoptóticos de genes ativados por EBNA-2 (revisto em 41).
BERF2	EBNA-3B	
BERF3/BERF4	EBNA-3C	
BWRF1	EBNA-LP	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da capacidade de EBNA-2 induzir a transcrição de LMP-1 (revisto em 7, 12).
BNLF1	LMP-1	<ul style="list-style-type: none"> • Mimetismo da sinalização pelo CD40, mediante o recrutamento de NF-κB, promoção da ativação, crescimento e sobrevivência celular (30, 31, 67; revisto em 2, 8, 37).
BNRF1	LMP-2A	<ul style="list-style-type: none"> • Mimetismo da sinalização pelo BCR, consequente promoção da sobrevivência celular (29; revisto em 2, 8, 41);

	LMP-2B	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da entrada em ciclo lítico (revisto em 8, 12, 34); • Bloqueio da sinalização intrínseca do BCR (revisto em 8, 12, 34); • Modulador negativo da função de LMP-2A (revisto em 42).
BCRF1	EBER 1, EBER 2*	<ul style="list-style-type: none"> • Indução da secreção de IL-10, consequente estímulo de crescimento celular e supressão da resposta das células T citotóxicas (revisto em 2, 8, 34). • Aumento do potencial tumorigénico de linhas celulares de LB, EBV-negativas (19).
<ul style="list-style-type: none"> • Região BamHI-A (BART) • Região BamHI-H (BHRF1) 	BART-miRNAs* BHRF1-miRNAs*	<ul style="list-style-type: none"> • Papel em larga medida desconhecido; são sugeridos efeitos de proliferação e sobrevivência celular nas fases iniciais da infeção latente (20)

BCR: receptor da célula B; EBERs: Epstein-Barr encoded RNAs; EBNA: Epstein-Barr nuclear antigen; ITAMs: “Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs”;

LMP: latent membrane protein; MHC: Complexo Major de Histocompatibilidade; miRNAs: microRNAs. *Produto de expressão não-proteico/ transcrito de RNA não-codificante

TABELA 2 - Padrões de expressão gênica do EBV na fase de latência da infecção.

Tipos de latência	Produtos de expressão gênica viral	Consequências
0	EBERs*; +/-miRNAs* (EBNA-1? LMP-2A?)	<u>“Programa de Verdadeira Latência”</u> : Ausência de expressão de proteínas virais, mecanismo de “escape” imunológico.
I	EBNA-1; EBERs*; miRNAs*	<u>Expressão isolada da proteína EBNA-1</u> : Manutenção e replicação do DNA vírico.
II	EBNA-1; LMP-1, -2A, -2B; EBERs*; miRNAs*	<u>“Programa de Sobrevivência”</u> : Interferência na regulação da apoptose, promoção da sobrevivência de linfócitos B .
III	EBNA-1, -2, -3A, -3B, 3C, -LP; LMP-1, -2A, -2B; EBERs*; miRNAs*	<u>“Programa de Crescimento”</u> : Interferência na regulação do ciclo celular, promoção da expansão linfóide B.

EBERs: Epstein-Barr encoded RNAs; EBNA: Epstein-Barr nuclear antigen; LMP: latent membrane protein; miRNAs: microRNAs. * Produtos de expressão gênica viral não-proteicos (transcritos de RNA).

TABELA 3 - Frequência de detecção e tipo de latência do EBV nas células tumorais de diferentes tipos de linfomas.

Linfoma	Associação ao EBV (%)	Tipo de Latência do EBV
Indivíduos imunossuprimidos		
Linfomas associados a imunodeficiências primárias	95	III
Linfomas pós-transplante	80	III (também I ou II)
Linfomas associados ao HIV <ul style="list-style-type: none"> • linfoma B periférico do SNC • linfoma de Hodgkin • linfoma B perif. de tipo efusão primária • linfoma B periférico difuso de grandes células • linfoma de Burkitt 	60 <ul style="list-style-type: none"> • 100 • ≈100 • 90 • até 80* • 30 	<ul style="list-style-type: none"> • III • II • I • I ou III • I
Indivíduos imunocompetentes		
Linfoma de Burkitt <ul style="list-style-type: none"> • endêmico • esporádico 	<ul style="list-style-type: none"> • 98 • 15-20 	I
Linfoma de Hodgkin clássico	40-100 †	II
Linfomas T periféricos <ul style="list-style-type: none"> • de tipo nasal NK/T • Leucemia agressiva de células NK • de tipo AILDS‡ 	100 90 >80	II I ou II I?, II?

CG: centro germinativo; EBV: Vírus de Epstein-Barr; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; pós-CG: pós-centro germinativo; SNC: sistema nervoso central.

*Variante imunoblástica do Linfoma B perif. difuso de células grandes. †Frequência de associação do EBV ao linfoma de Hodgkin clássico variável em função da distribuição geográfica, faixa etária, subtipo histológico e competência do sistema imunológico. ‡ AILDs: “angioimmunoblastic lymphadenopathy”

FIGURA 1

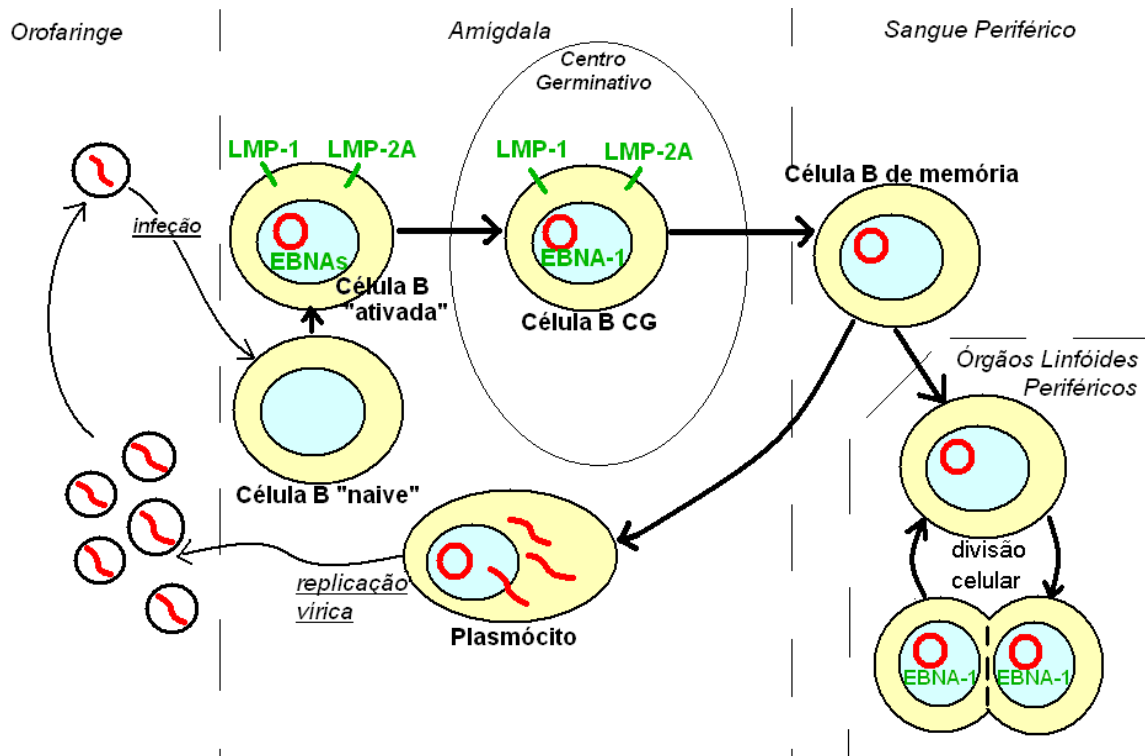


Fig. 1 – Modelo de estabelecimento de infecção persistente proposto por Thorley-Lawson e colaboradores. Na orofaringe, as partículas víricas de EBV infetam linfócitos B “naive” do tecido linfóide do anel de Waldeyer. Estas células são ativadas e expandem-se clonalmente sob influência da expressão do “programa de crescimento” do vírus, de forma análoga aos linfócitos B ativados pelo reconhecimento de um antígeno. Após a expansão clonal, as células B infetadas continuam a diferenciar-se, numa reação de centro germinativo, onde exprimem um padrão de genes víricos mais restrito, o “programa de sobrevivência”, no qual as LMP-1 e LMP-2A substituem a sinalização dos CD40 e BCR, respetivamente, promovendo a sobrevivência celular. As células B infetadas do CG diferenciam-se em células B de memória que, sem expressão de proteínas víricas (“programa de verdadeira latência”), constituem o reservatório celular da infecção persistente. Durante a divisão celular, as células B de memória expressam a proteína EBNA-1 que permite a replicação do DNA vírico. Quando as células B de memória são ativadas por antígenos diferenciam-se em plasmócitos; nestas, o EBV entra em fase lítica da infecção sendo libertadas novas partículas víricas (23, 28).

ANEXOS

Normas de Publicação da revista “Arquivos de Medicina” (ver páginas seguintes)

Instruções aos Autores

Estas instruções seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: www.icmje.org).

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam investigação original nas diferentes áreas da medicina, favorecendo investigação de qualidade, particularmente a que descreva a realidade nacional.

Os manuscritos são avaliados inicialmente por membros do corpo editorial e a publicação daqueles que forem considerados adequados fica dependente do parecer técnico de pelo menos dois revisores externos. A revisão é feita anonimamente, podendo os revisores propor, por escrito, alterações de conteúdo ou de forma ao(s) autor(es), condicionando a publicação do artigo à sua efectivação.

Todos os artigos solicitados serão submetidos a avaliação externa e seguirão o mesmo processo editorial dos artigos de investigação original.

Apesar dos editores e dos revisores desenvolverem os esforços necessários para assegurar a qualidade técnica e científica dos manuscritos publicados, a responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

Todos os artigos publicados passam a ser propriedade dos ARQUIVOS DE MEDICINA. Uma vez aceites, os manuscritos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento dos ARQUIVOS DE MEDICINA.

Apenas serão avaliados manuscritos contendo material original que não estejam ainda publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam a ser submetidos para publicação noutros locais. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas. Quando existem publicações semelhantes à que é submetida ou quando existirem dúvidas relativamente ao cumprimento dos critérios acima mencionados estas devem ser anexadas ao manuscrito em submissão.

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores têm que assegurar todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido.

De acordo com uma avaliação efectuada sobre o material apresentado à revista os editores dos ARQUIVOS DE MEDICINA prevêem publicar aproximadamente 30% dos manuscritos submetidos, sendo que cerca de 25% serão provavelmente rejeitados pelos editores no primeiro mês após a recepção sem avaliação externa.

TIPOLOGIA DOS ARTIGOS PUBLICADOS NOS ARQUIVOS DE MEDICINA

Artigos de investigação original

Resultados de investigação original, qualitativa ou quantitativa.

O texto deve ser limitado a 2000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 4 tabelas e/ou figuras (total) e até 15 referências.

Todos os artigos de investigação original devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Publicações breves

Resultados preliminares ou achados novos podem ser objecto de publicações breves.

O texto deve ser limitado a 1000 palavras, excluindo referências e tabelas, e organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As publicações breves devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Artigos de revisão

Artigos de revisão sobre temas das diferentes áreas da medicina e dirigidos aos profissionais de saúde, particularmente com impacto na sua prática.

Os ARQUIVOS DE MEDICINA publicam essencialmente artigos de revisão solicitados pelos editores. Contudo, também serão avaliados artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia, preferencialmente revisões quantitativas (Meta-análise).

O texto deve ser limitado a 5000 palavras, excluindo referências e tabelas, e apresentar um máximo de 5 tabelas e/ou figuras (total). As revisões quantitativas devem ser organizadas em introdução, métodos, resultados e discussão.

As revisões devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada, devendo ser estruturados no caso das revisões quantitativas.

Comentários

Comentários, ensaios, análises críticas ou declarações de posição acerca de tópicos de interesse na área da saúde, designadamente políticas de saúde e educação médica.

O texto deve ser limitado a 900 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

Os comentários não devem apresentar resumos.

Casos clínicos

Os ARQUIVOS DE MEDICINA transcrevem casos publicamente apresentados trimestralmente pelos médicos do Hospital de S. João numa selecção acordada com o corpo editorial da revista. No entanto é bem vinda a descrição de casos clínicos verdadeiramente exemplares, profundamente estudados e discutidos. O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

Os casos clínicos devem apresentar resumos não estruturados em português e em inglês, com um máximo de 120 palavras cada.

Séries de casos

Descrições de séries de casos, tanto numa perspectiva de tratamento estatístico como de reflexão sobre uma experiência particular de diagnóstico, tratamento ou prognóstico.

O texto deve ser limitado a 1200 palavras, excluindo referências e tabelas, organizado em introdução, métodos, resultados e discussão, com um máximo de 2 tabelas e/ou figuras (total) e até 10 referências.

As séries de casos devem apresentar resumos estruturados em português e em inglês, com um máximo de 250 palavras cada.

Cartas ao editor

Comentários sucintos a artigos publicados nos ARQUIVOS DE MEDICINA ou relatando de forma muito objectiva os resultados de observação clínica ou investigação original que não justifiquem um tratamento mais elaborado.

O texto deve ser limitado a 400 palavras, excluindo referências e tabelas, e incluir no máximo uma tabela ou figura e até 5 referências.

As cartas ao editor não devem apresentar resumos.

Revisões de livros ou software

Revisões críticas de livros, software ou sítios da internet.

O texto deve ser limitado a 600 palavras, sem tabelas nem figuras, com um máximo de 3 referências, incluindo a do objecto da revisão.

As revisões de livros ou software não devem apresentar resumos.

FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

A formatação dos artigos submetidos para publicação nos ARQUIVOS DE MEDICINA deve seguir os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

Todo o manuscrito, incluindo referências, tabelas e legendas de figuras, deve ser redigido a dois espaços, com letra a 11 pontos, e justificado à esquerda.

Aconselha-se a utilização das letras Times, Times New Roman, Courier, Helvetica, Arial, e Symbol para caracteres especiais.

Devem ser numeradas todas as páginas, incluindo a página do título.

Devem ser apresentadas margens com 2,5 cm em todo o manuscrito.

Devem ser inseridas quebras de página entre cada secção.

Não devem ser inseridos cabeçalhos nem rodapés.

Deve ser evitada a utilização não técnica de termos estatísticos como aleatório, normal, significativo, correlação e amostra.

Apenas será efectuada a reprodução de citações, tabelas ou ilustrações de fontes sujeitas a direitos de autor com citação completa da fonte e com autorizações do detentor dos direitos de autor.

Unidades de medida

Devem ser utilizadas as unidades de medida do Sistema Internacional (SI), mas os editores podem solicitar a apresentação de outras unidades não pertencentes ao SI.

Abreviaturas

Devem ser evitados acrónimos e abreviaturas, especialmente no título e nos resumos. Quando for necessária a sua utilização devem ser definidos na primeira vez que são mencionados no texto e também nos resumos e em cada tabela e figura, excepto no caso das unidades de medida.

Nomes de medicamentos

Deve ser utilizada a Designação Comum Internacional (DCI) de fármacos em vez de nomes comerciais de medicamentos. Quando forem utilizadas marcas registadas na investigação, pode ser mencionado o nome do medicamento e o nome do laboratório entre parêntesis.

Página do título

Na primeira página do manuscrito deve constar:

- 1) o título (conciso e descritivo);
- 2) um título abreviado (com um máximo de 40 caracteres, incluindo espaços);
- 3) os nomes dos autores, incluindo o primeiro nome (não incluir graus académicos ou títulos honoríficos);
- 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado;
- 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e e-mail;
- 6) os agradecimentos, incluindo fontes de financiamento, bolsas de estudo e colaboradores que não cumpram critérios para autoria;
- 7) contagens de palavras separadamente para cada um dos resumos e para o texto principal (não incluindo referências, tabelas ou figuras).

Autoria

Como referido nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", a autoria requer uma contribuição substancial para:

- 1) concepção e desenho do estudo, ou obtenção dos dados, ou análise e interpretação dos dados;
- 2) redacção do manuscrito ou revisão crítica do seu conteúdo intelectual;
- 3) aprovação final da versão submetida para publicação.

A obtenção de financiamento, a recolha de dados ou a supervisão geral do grupo de trabalho, por si só, não justificam autoria.

É necessário especificar na carta de apresentação o contributo de cada autor para o trabalho. Esta informação será publicada.

Exemplo: José Silva concebeu o estudo e supervisionou todos os aspectos da sua implementação. António Silva colaborou na concepção do estudo e efectuou a análise dos dados. Manuel Silva efectuou a recolha de dados e colaborou na sua análise. Todos os autores contribuíram para a interpretação dos resultados e revisão dos rascunhos do manuscrito.

Nos manuscritos assinados por mais de 6 autores (3 autores no caso das cartas ao editor), tem que ser explicitada a razão de uma autoria tão alargada.

É necessária a aprovação de todos os autores, por escrito, de quaisquer modificações da autoria do artigo após a sua submissão.

Agradecimentos

Devem ser mencionados na secção de agradecimentos os colaboradores que contribuíram substancialmente para o trabalho mas que não cumpram os critérios para autoria, especificando o seu contributo, bem como as fontes de financiamento, incluindo bolsas de estudo.

Resumos

Os resumos de artigos de investigação original, publicações breves, revisões quantitativas e séries de casos devem ser estruturados (introdução, métodos, resultados e conclusões) e apresentar conteúdo semelhante ao do manuscrito.

Os resumos de manuscritos não estruturados (revisões não quantitativas e casos clínicos) também não devem ser estruturados.

Nos resumos não devem ser utilizadas referências e as abreviaturas devem ser limitadas ao mínimo.

Palavras-chave

Devem ser indicadas até seis palavras-chave, em português e em inglês, nas páginas dos resumos, preferencialmente em concordância com o Medical Subject Headings (MeSH) utilizado no Index Medicus. Nos manuscritos que não apresentam resumos as palavras-chave devem ser apresentadas no final do manuscrito.

Introdução

Deve mencionar os objectivos do trabalho e a justificação para a sua realização.

Nesta secção apenas devem ser efectuadas as referências indispensáveis para justificar os objectivos do estudo.

Métodos

Nesta secção devem descrever-se:

- 1) a amostra em estudo;
- 2) a localização do estudo no tempo e no espaço;
- 3) os métodos de recolha de dados;
- 4) análise dos dados.

As considerações éticas devem ser efectuadas no final desta secção.

Análise dos dados

Os métodos estatísticos devem ser descritos com o detalhe suficiente para que possa ser possível reproduzir os resultados apresentados.

Sempre que possível deve ser quantificada a imprecisão das estimativas apresentadas, designadamente através da apresentação de intervalos de confiança. Deve evitar-se uma utilização excessiva de testes de hipóteses, com o uso de valores de p, que não fornecem informação quantitativa importante.

Deve ser mencionado o software utilizado na análise dos dados.

Considerações éticas e consentimento informado

Os autores devem assegurar que todas as investigações envolvendo seres humanos foram aprovadas por comissões de ética das instituições em que a investigação tenha sido desenvolvida, de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial (www.wma.net).

Na secção de métodos do manuscrito deve ser mencionada esta aprovação e a obtenção de consentimento informado, quando aplicável.

Resultados

Os resultados devem ser apresentados, no texto, tabelas e figuras, seguindo uma sequência lógica.

Não deve ser fornecida informação em duplicado no texto e nas tabelas ou figuras, bastando descrever as principais observações referidas nas tabelas ou figuras.

Independentemente da limitação do número de figuras propostos para cada tipo de artigo, só devem ser apresentados gráficos quando da sua utilização resultarem claros benefícios para a compreensão dos resultados.

Apresentação de dados numéricos

A precisão numérica utilizada na apresentação dos resultados não deve ser superior à permitida pelos instrumentos de avaliação.

Para variáveis quantitativas as medidas apresentadas não deverão ter mais do que uma casa decimal do que os dados brutos.

As proporções devem ser apresentadas com apenas uma casa decimal e no caso de amostras pequenas não devem ser apresentadas casas decimais.

Os valores de estatísticas teste, como t ou χ^2 , e os coeficientes de correlação devem ser apresentados com um máximo de duas casas decimais.

Os valores de p devem ser apresentados com um ou dois algarismos significativos e nunca na forma de p=NS, p<0,05 ou p>0,05, na medida em que a informação contida no valor de P pode ser importante. Nos casos em

que o valor de p é muito pequeno (inferior a 0,0001), pode apresentar-se como $p < 0,0001$.

Tabelas e figuras

As tabelas devem surgir após as referências. As figuras devem surgir após as tabelas.

Devem ser mencionadas no texto todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras) de acordo com a ordem em que são discutidas no texto.

Cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto do manuscrito.

Para as notas explicativas das tabelas ou figuras devem ser utilizados os seguintes símbolos, nesta mesma sequência:

*, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡.

Cada tabela ou figura deve ser apresentada em páginas separadas, juntamente com o título e as notas explicativas.

Nas tabelas devem ser utilizadas apenas linhas horizontais.

As figuras, incluindo gráficos, mapas, ilustrações, fotografias ou outros materiais devem ser criadas em computador ou produzidas profissionalmente.

As figuras devem incluir legendas.

Os símbolos, setas ou letras devem contrastar com o fundo de fotografias ou ilustrações.

A dimensão das figuras é habitualmente reduzida à largura de uma coluna, pelo que as figuras e o texto que as acompanha devem ser facilmente legíveis após redução.

Na primeira submissão do manuscrito não devem ser enviados originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como películas de raios-X. As figuras, criadas em computador ou convertidas em formato electrónico após digitalização devem ser inseridas no ficheiro do manuscrito.

Uma vez que a impressão final será a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos não deverão ter cores. Gráficos a três dimensões apenas serão aceites em situações excepcionais.

A resolução de imagens a preto e branco deve ser de pelo menos 1200 dpi e a de imagens com tons de cinzento ou a cores deve ser de pelo menos 300 dpi.

As legendas, símbolos, setas ou letras devem ser inseridas no ficheiro da imagem das fotografias ou ilustrações.

Os custos da publicação das figuras a cores serão suportados pelos autores.

Em caso de aceitação do manuscrito, serão solicitadas as figuras nos formatos mais adequados para a produção da revista.

Discussão

Na discussão não deve ser repetida detalhadamente a informação fornecida na secção dos resultados, mas devem ser discutidas as limitações do estudo, a relação dos resultados obtidos com o observado noutras investigações e devem ser evidenciados os aspectos inovadores do estudo e as conclusões que deles resultam.

É importante que as conclusões estejam de acordo com os objectivos do estudo, mas devem ser evitadas afirmações e conclusões que não sejam completamente apoiadas pelos resultados da investigação em causa.

Referências

As referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. Os números das referências devem ser apresentados entre parentesis. Não deve ser utilizado software para numeração automática das referências.

Pode ser encontrada nos "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" uma descrição pormenorizada do formato dos diferentes tipos de referências, de que se acrescentam alguns exemplos:

1. Artigo

• Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increase risk for pancreaticobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

2. Artigo com Organização como Autor

• The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 64:282-4.

3. Artigo publicado em Volume com Suplemento

• Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-82.

4. Artigo publicado em Número com Suplemento

payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

5. Livro

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers;1996.

6. Livro (Editor(s) como Autor(es))

Norman IJ, Redfern SJ, editores. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone;1996.

7. Livro (Organização como Autor e Editor)

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute;1992.

8. Capítulo de Livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press;1995. p. 465-78.

9. Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Devem ser utilizados os nomes abreviados das publicações, de acordo com o adoptado pelo Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Deve ser evitada a citação de resumos e comunicações pessoais.

Os autores devem verificar se todas as referências estão de acordo com os documentos originais.

Anexos

Material muito extenso para a publicação com o manuscrito, designadamente tabelas muito extensas ou instrumentos de recolha de dados, poderá ser solicitado aos autores para que seja fornecido a pedido dos interessados.

Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem revelar no momento da submissão a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência.

Essa informação será mantida confidencial durante a revisão do manuscrito pelos avaliadores externos e não influenciará a decisão editorial mas será publicada se o artigo for aceite.

Autorizações

Antes de submeter um manuscrito aos ARQUIVOS DE MEDICINA os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- consentimento informado de cada participante;
- consentimento informado de cada indivíduo presente em fotografias, mesmo quando forem efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- transferência de direitos de autor de imagens ou ilustrações;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;
- autorizações dos colaboradores mencionados na secção de agradecimentos.

SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS

Os manuscritos submetidos aos ARQUIVOS DE MEDICINA devem ser preparados de acordo com as recomendações acima indicadas e devem ser acompanhados de uma carta de apresentação.

Carta de apresentação

Deve incluir a seguinte informação:

- 1) Título completo do manuscrito;
- 2) Nomes dos autores com especificação do contributo de cada um para o manuscrito;
- 3) Justificação de um número elevado de autores, quando aplicável;
- 4) Tipo de artigo, de acordo com a classificação dos ARQUIVOS DE MEDICINA;
- 5) Fontes de financiamento, incluindo bolsas;
- 6) Revelação de conflitos de interesse ou declaração da sua ausência;
- 7) Declaração de que o manuscrito não foi ainda publicado, na íntegra ou em parte, e que nenhuma versão do manuscrito está a ser avaliada por outra revista;
- 8) Declaração de que todos os autores aprovaram a versão do manuscrito que está a ser submetida;
- 9) Assinatura de todos os autores.

É dada preferência à submissão dos manuscritos por e-mail (submit@arquivosdemedicina.org).

O manuscrito e a carta de apresentação devem, neste caso, ser enviados em ficheiros separados em formato word. Deve ser enviada por fax (225074374) uma cópia da carta de apresentação assinada por todos os autores.

Se não for possível efectuar a submissão por e-mail esta pode ser efectuada por correio para o seguinte endereço:

ARQUIVOS DE MEDICINA
Faculdade de Medicina do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
4200 – 319 Porto, Portugal

Os manuscritos devem, então, ser submetidos em triplicado (1 original impresso apenas numa das páginas e 2 cópias com impressão frente e verso), acompanhados da carta de apresentação.

Os manuscritos rejeitados ou o material que os acompanha não serão devolvidos, excepto quando expressamente solicitado no momento da submissão.

CORRECÇÃO DOS MANUSCRITOS

A aceitação dos manuscritos relativamente aos quais forem solicitadas alterações fica condicionada à sua realização.

A versão corrigida do manuscrito deve ser enviada com as alterações sublinhadas para facilitar a sua verificação e deve ser acompanhada duma carta respondendo a cada um dos comentários efectuados.

Os manuscritos só poderão ser considerados aceites após confirmação das alterações solicitadas.

MANUSCRITOS ACEITES

Uma vez comunicada a aceitação dos manuscritos, deve ser enviada a sua versão final em ficheiro de Word®, formatada de acordo com as instruções acima indicadas.

No momento da aceitação os autores serão informados acerca do formato em que devem ser enviadas as figuras.

A revisão das provas deve ser efectuada e aprovada por todos os autores dentro de três dias úteis. Nesta fase apenas se aceitam modificações que decorram da correcção de gralhas.

Deve ser enviada uma declaração de transferência de direitos de autor para os ARQUIVOS DE MEDICINA, assinada por todos os autores, juntamente com as provas corrigidas.